

На правах рукописи

Салли Мохамед Абделаиз Эльшафей

**ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ *NIGELLA SATIVA*,
SALVIA OFFICINALIS И *TRICHODERMA* НА ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ**

03.01.04. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

Алимова Фарида Кашифовна

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Языкова Марина Юрьевна

доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Самарский государственный
университет" профессор кафедры
биохимии, биотехнологии и
биоинженерии, г. Самара.

Гоголев Юрий Викторович

доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки "Казанский институт
биохимии и биофизики Казанского
научного центра" Российской академии
наук, заведующий лабораторией
молекулярной биологии, г. Казань.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Федеральный центр
токсикологической, радиационной и
биологической безопасности» (ФГБУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань.

Защита диссертации состоится «12» февраля 2015 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, Институт фундаментальной медицины и биологии в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан

« » 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Всемирная организация здравоохранения и Европейский Союз (ЕС) выступают за необходимость выпуска стандартизированных эффективных лекарственных средств природного происхождения. В связи с их большей безопасностью по сравнению с химически синтезированными лекарственными препаратами, для которых характерен риск серьезных побочных эффектов (Лепяхин В.К. и др., 2002; Orhan I.E., 2014; Ujvary I., 2014). Показана необходимость расширения не только количества биопрепаратов медицинского назначения на основе растительного и микробного сырья, а также спектра их применения (Алимова Ф.К. и др., 2007; Human A.H., Simons K., 2011; Громовых Т.И. и др., 2014). Биопрепараты приобретают большое значение в современном обществе также и для профилактической медицины, т.к. современный фармакологический рынок испытывает недостаток медицинских препаратов с протекторным действием и известным молекулярным механизмом (Вайновская И.Ф., 2011; Исакова А.Л., Прохоров В.Н., 2014; Gupta V.G. et al., 2014). С древних времен известно, что экстракты лекарственных растений обладают биологической активностью, антибактериальными, противогрибковыми, антиоксидантными и другими свойствами (Properzi A. et al., 2013). Одним из широко известных медицинских фитопрепаратов являются препараты на основе черного тмина - *Nigella sativa* (Zaman R., Akhtar M.S., 2004; Al-Sheddi E.S. et al., 2014) и шалфея - *Salvia officinalis* (Lima S.F. et al., 2004). *Nigella sativa* является одним из традиционно используемых растений для лечения опухолевых заболеваний (Houghton P.J. et al., 1995; Al-Sheddi E.S. et al., 2014), для поднятия иммунитета, гепатопротекторным действием и др. (Al-Hader A. et al., 1993; El Tahir K.E. et al., 1998). Описано более 19 видов физиологически активных метаболитов этого растения. Тем не менее, многие клинические исследования нуждаются в дальнейшей оценке эффективности и безопасности в терапевтическом применении (Llaiyaraaja N., Khanum F., 2010). *Salvia officinalis* – растение, хорошо известно своим противовоспалительным, противодиабетическим и антиоксидантным действием. Тем не менее, механизмы действия физиологически активных веществ *S.officinalis* до настоящего времени не имеют биологического экспериментального подтверждения (Deans S.G., Simpson E.J.M., 2000; Lima S.F. et al., 2004). Биопрепараты на основе грибов рода *Trichoderma* выращиваются в промышленных масштабах на отходах растениеводства для применения в промышленности, а также в сельском хозяйстве как фунгициды и регуляторы роста растений (Алимова Ф.К. 2005; Громовых Т.И. и др. 2014; Gupta V.G. et al., 2014). Однако в последнее время появились сообщения о возможности применения метаболитов *Trichoderma* и в медицине (Смирнова И.П. и др., 2005; Schuster A., Schmoll M., 2010; Тухбатова Р.И. и др., 2012). Перед фармакологией стоит задача изыскание и синтез не только новых лекарственных препаратов, но и расширение спектра применения хорошо известных. Производство любых биопрепаратов, как правило, сопряжено с накоплением отходов. Согласно современным подходам, производство фитопрепаратов медицинского назначения должно быть также экологически целесообразным. Разработка биологических препаратов на основе отходов производства медицинских фитопрепаратов лишенных побочных эффектов, представляется также важной задачей для сельскохозяйственной биотехнологии (Ткаченко К.Г., 2011; Симчук А.П., 2013).

Степень разработанности темы исследования. Проводимые зарубежные исследования в области производства лекарственных биопрепаратов основаны на сборе биологически безопасного растительного или микробного материала с высокой активностью (Gali-Muhtasib H. et al., 2004; Lima S.F. 2006; Al-Sheddi E.S. et al., 2014; Gupta V.G. et al., 2014). Разработка диссертационной темы начата на основе предыдущих экспериментальных исследований, проводимых на кафедре биохимии и биотехнологии, Казанского федерального университета (Алимова Ф.К. и др., 2007; Тазетдинова Д.И., 2008; Абдельрахман А.А., 2011; Тухбатова Р.И. и др., 2012). Показано что биопрепарат Фитотрикс на основе *T.asperellum* может быть использован не только в агробиотехнологии, но и в медицине. Испытаны два вида микромицетов рода *Trichoderma*. Показано что *Trichoderma* может использоваться как фунгицид и стимулятор роста кукурузы. Получены предварительные данные о протекторном действии биопрепарата на основе *Trichoderma* при заболевании печени и почек у мышей, цитотоксическом действии к опухолевым клеткам линии Hela. Отобран наиболее эффективный вид *T.asperellum* 551 (Абдельрахман А.А., 2011). В настоящей работе продолжены исследования по применению метаболитов *Trichoderma asperellum* 551 как лекарственного средства с противоопухолевым и гепатопротекторным действием. Исследовалась биологическая активность биопрепаратов на основе *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в отношении культур неперерожденных и раковых клеток, а также лабораторных животных по сравнению с известным противоопухолевым фитопрепаратом на основе *N. sativa*. Исследовалась фунгистатическая активность фитопрепаратов по отношению патогенных микромицетов по сравнению с известным биофунгицидом на основе *T. asperellum*. Актуальной задачей для изучения является возможность использования отходов производства лекарственных фитопрепаратов в агробиотехнологии для защиты от фитопатогенных грибов и стимуляции роста растений. Рассматривается возможность использования биопрепаратов на основе отходов производств *N. sativa* и *S. officinalis* по сравнению с биопрепаратом на основе *T. asperellum* 551 как биофунгицидов и фиторегуляторов.

Цель и задачи исследований. Цель данной работы - расширение спектра применения растительных фитопрепаратов медицинского значения на основе *N. sativa*, *S. officinalis* и отходов их производства, а также биопрепарата на основе *T. asperellum* 551 в медицине и агробиотехнологии. В соответствии с поставленной целью работы решались следующие задачи:

1. Оценить цитотоксическое действие биопрепаратов на основе *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в отношении клеточных линий Hek 293, Hela и MCF-7 по сравнению с противоопухолевым действием биопрепарата на основе *N. sativa*.
2. Выявить гепатопротекторное действие *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 по изменению физиологических, биохимических, гематологических и гистологических показателей у мышей стока CD-1 по сравнению с влиянием *N. sativa* на фоне воздействия тетрахлорметана (CCl₄).
3. Определить фунгистатические характеристики биопрепаратов на основе *N. sativa*, *S. officinalis* по изменению физиологических и биохимических параметров патогенных и фитопатогенных грибов: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus awamori* и *Fusarium oxysporum* по сравнению с фунгистатическим действием *T. asperellum* 551.

4. Оценить роль экстрактов на основе растительных отходов производства лекарственных масел из *N. sativa*, *S. officinalis* в изменении биохимических и биоморфологических характеристик кукурузы по сравнению с влиянием биопрепарата на основе *T. asperellum* 551.

Научная новизна работы. Впервые установлено противоопухолевое, гепатопротекторное и фунгистатическое действия растительного масла *S. officinalis*. Противоопухолевое и гепатопротекторное действия растительного масла *S. officinalis* не уступает по эффективности фитопрепарату на основе масел *N. sativa*, а фунгистатическое действие - биопрепарату на основе *Trichoderma*. Впервые установлено фунгистатическое действие масел *N. sativa* и его безопасность в отношении перерожденных клеток Нек 293. Фунгистатическое действие масел *N. sativa* превосходит по эффективности биофунгицид на основе *T. asperellum* 551.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены экспериментальные основания для расширения спектра практического применения биопрепаратов на основе *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в медицине и агробιοтехнологии. Цитотоксичность метаболитов *T. asperellum* 551 и растительных экстрактов *N. sativa* и *S. officinalis* по отношению к линиям раковых клеток указывает на возможность использования этих биологических веществ в поддержке больных с онкологическими заболеваниями. Дешевизна и безопасность производства метаболитов *T. asperellum* 551, а также растительных экстрактов является предпосылкой для промышленного производства этих веществ и разработки в дальнейшем противоопухолевых препаратов. Расширен спектр возможных биопрепаратов с гепатопротекторным действием за счет фитопрепарата на основе *S. officinalis* и биопрепарата Фитотрикс на основе *Trichoderma*. Отходы производства фитопрепарата на основе *S. officinalis* могут быть использованы в качестве биофунгицидов и стимуляторов роста кукурузы, а масла *N. sativa* - в производстве биофунгицидов. Результаты работы могут быть использованы в учебном процессе в рамках дисциплин «Биотехнология», «Биологически активные вещества микробного и растительного происхождения» и «Фармакология».

Положения, выносимые на защиту:

1. Растительные масла *N. sativa*, *S. officinalis* и внеклеточные метаболиты *T. asperellum* 551 оказывают противоопухолевое действие в опытах *in vitro* и *in vivo* и не обладают цитотоксической активностью в отношении перерожденных клеток. Биологические активные экстракты аттенуируют канцерогенную активность тетрахлорметана (CCl₄) и обладают гепатопротекторной активностью у мышей стока CD-1.
2. Масла *N. sativa* обладают фунгистатическим действием в отношении патогенных и фитопатогенных микромицетов, и превосходит известный биофунгицид на основе *T. asperellum* 551.
3. Растительные экстракты *S. officinalis* и метаболиты *T. asperellum* 551 оказывают комплексное позитивное адаптогенное влияние на растения кукурузы, путем стимуляции роста и развития, а также подавления фитопатогенных грибов.
4. Суммарная биологическая активность исследуемых биопрепаратов по воздействию на отдельные параметры живых систем возрастает в ряду: *S. officinalis* > *N. Sativa* > *T. asperellum* 551.

Степень достоверности результатов исследования. Все научные положения и выводы обоснованы с применением системного анализа поставленной темы исследования, современных методов научно-биологических исследований, достоверной выборкой испытуемых, большим объемом фактического материала, который подвергнут математическому анализу. Все проведенные исследования подтверждаются большим объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и анализированных на современных приборах с высокой точностью; опубликованием полученных данных в Российской и международном научных журналах после рецензирования манускриптов ведущими учеными в данной области; сопоставлением с новыми данными и апробированием возможности использования исследуемых препаратов в поддержке больных с онкологическими заболеваниями и в качестве стимуляторов роста и развития сельскохозяйственных важных растений.

Апробация работы. Основные положения результаты диссертации представлены на следующих конференциях: Третья международная научная интернет-конференция Казанского федерального университета «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (19-22 ноября 2012 г.); Ежегодная научная конференция Казанского федерального университета (31 января 2013); Вторая международная научная интернет-конференция Казанского федерального университета «Биотехнология. Взгляд в будущее» (26-27 марта 2013 г.); Вторая международная научная интернет-конференция «Современные тенденции в сельском хозяйстве» Казань, (10-11 октября 2013 г.); Четвёртая международная научная интернет-конференция Казанского федерального университета «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (16-17 октября 2013 г.); Международный симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни», посвященного 150-летию образования кафедры биохимии Казанского федерального университета (21-23 ноября 2013г.); Третья международная научная интернет-конференция Казанского федерального университета «Биотехнология. Взгляд в будущее» (25-26 марта 2014 г.); Четвёртая международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казанский федеральный университет, Казань, 29 октября – 1 ноября 2014.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа выполнена в соответствии с тематическим планом института фундаментальной медицины и биологии КФУ в рамках проекта «Биохимические, молекулярно-генетические и биоинформационные аспекты взаимодействия нано и биопрепаратов с живыми организмами» (НИР КФУ, девиз Бюджет 12-01), НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний» и «Разработка опытного образца биоудобрения с двойным эффектом для растениеводства. Лабораторные исследования свойств опытного образца биоудобрения». Госконтракт с Фондом содействия развитию МП НТС (30.05.2011-17.09.2013, N No.9375p/15160).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работы, из них 1 статья в зарубежном издании, включенном в базу систем цитирования ISI Web of Science и Scopus, 4 статей в Российских изданиях, включенных в список Высшей аттестационной комиссии (ВАК), 9 материалов международных и Всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 168 страницах машинописного текста, иллюстрирована 4 таблицами и 39 рисунками. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и выводов, а также списка литературы, состоящего из 48 отечественных и 188 зарубежных публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Объекты исследований

1.1.1. Растительные препараты. Масла, экстрагированные из семян *N. sativa* и *S. officinalis*, произведенные фирмой El Hawag Factory (Bader city, Egypt). Растительные водные экстракты из отходов производства масел *N. sativa* и *S. officinalis*.

1.1.2. Штаммы *Trichoderma*. В работе был использован штамм *T. asperellum* 551, выделенный из почв Республики Татарстан и используемый для производства биопрепарата Фитотрикс.

1.1.3. Объекты воздействия биопрепаратов.

1.1.3.1. Клеточные линии человека. Клеточные линии Hek 293, HeLa и MCF-7, были куплены из фермы Sigma Pvt. Ltd. St. Louis, MO, USA. Клетки выращивали на среде DMEM. Инкубировали в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C.

1.1.3.2. Подопытные животные (сток мышей CD-1). Здоровые взрослые самцы швейцарских белых мышей на стадии 10-12 недель с массой тела ~20 г, были получены из Российской академии наук, Филиал института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пущино, Россия.

1.1.3.3. Патогенные и фитопатогенные грибы. Патогенный штамм *A. flavus* и *A. niger* получены из ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Фитопатогенный штамм *F. oxysporum* получен из музея кафедры биохимии и биотехнологии КФУ. Штамм *A. awamori* 66А предоставлен лабораторией исследования клеток микромицетов Эдинбургского университета как безопасная модель для работы *in vitro*.

1.1.3.4. Семена кукурузы. Исследования проводили на семенах кукурузы двух сортов: Краснодарский 194 МВ РСт F1 и Поволжский 188 М В1, F1.

1.2. Методы исследований.

1.2.1. Определения синтеза микотоксинов *T. asperellum* 551. Для определения синтеза микотоксинов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) культуры штаммов *A. flavus* и *T. asperellum* 551 инокулировали в жидкую среду глюкозо-картофельный бульон и инкубировали при 28°C в течение 18 суток при аэрации 130 об/мин. Культуральную жидкость использовали для иммуноферментного анализа (ИФА) афлатоксина В1 и охратоксина (Урусов А.Е., 2012).

1.2.2. Определение активности лектинов у *T. asperellum* 551. Для приготовления гомогената микромицеты культивировали на Глюкозо-картофельном бульоне (ГКБ) в течение 7 суток при 28°C. Мицелий собирали фильтрованием и промывали дистиллированной водой. Для определения гемагглютинирующей активности лектинов использовали реакцию агглютинации эритроцитов человека 1 группы крови. (De-Mfsa M.D. et al., 2004).

1.2.3. Анализ жизнеспособности неперерожденных и раковых клеток (Hek, HeLa и MCF-7). Клетки высевали в 96-ти луночные планшеты в концентрации 0,5*10⁵ клеток/мл. Через 24 часа заменили питательную среду, добавив тестируемые

соединения в различных концентрациях (0, 20, 40, 60, 80 и 100 мг/мл) и инкубировали еще 24 часа. Процент жизнеспособных клеток производили по формуле (Patel S. et al., 2009):

$$V = \frac{(a - b) * 100\%}{a}$$

Где: а – общее количество клеток; b – количество мертвых клеток.

1.2.4. Цитотоксический анализ. Клетки высевали в 96-ти луночные планшеты в концентрации $0,5 * 10^5$ клеток/мл. Через 24 часа заменили питательную среду, добавив тестируемые соединения в различных концентрациях и инкубировали 72 часа. За ингибирующую концентрацию (IC50) принималась концентрация тестируемых веществ, вызывающая ингибирование роста клеток на 50% относительно контроля с использованием линейной регрессии кривых доза-ответ по SOFTmaxPro. (Patel S. et al., 2009).

1.2.5. Изучение изменения морфологии перерожденных и раковых клеток (Hek, HeLa и MCF-7). Определяли согласно методике Al-Sheddi E.S. et al., (2014) Изменения в морфологии клеток под воздействием масел визуализировали с помощью оптического микроскопа.

1.2.6. TMRE-анализ мембранного потенциала митохондрий перерожденных и раковых клеток (Бондарь О.В., 2013).

1.2.7. Изучение гепатопротекторного влияния масел *N. sativa*, *S. officinalis* и метаболитов *T. asperellum* 551 на физические, биохимические, гематологические и гистологические параметры мышей стока CD-1 получавших тетрахлорметан.
Схема опыта. Мышам вводили культуральную жидкость *T. asperellum* 551, масло *N. sativa*, *S. officinalis* и тетрахлорметан в следующих дозировках: CCl₄ - 80 мкл / 10г вес тела, *N. sativa* - 50 мкл / 10г вес тела, КЖ - 125 мкл/10г вес тела, оливковое масло - 80 мкл / 10г вес тела, *S. officinalis* - 40 мкл / 10г вес тела. За основу эксперимента был взят метод, описанный ранее в работе (Farhoudi M., Ghodrati Zadeh S., 2011). Первая группа мышей являлась контролем и получала внутрибрюшинно раз в три дня оливковое масло. Вторая группа получала внутрибрюшинно CCl₄ – на первой неделе и масло *N. sativa* перорально – на второй неделе. Третья группа получала внутрибрюшинно CCl₄ – на первой неделе и масло *S. officinalis* – на второй неделе. Четвертая группа получала внутрибрюшинно CCl₄ – на первой неделе и КЖ *T. asperellum* 551 – на второй неделе. Пятая группа получала масло *N. Sativa* перорально – на первой неделе и внутрибрюшинно CCl₄ – на второй неделе. Шестая группа получала масло *S. officinalis* – на первой неделе и внутрибрюшинно CCl₄ – на второй неделе. Седьмая группа получала КЖ *T. asperellum* 551 перорально – на первой неделе и внутрибрюшинно CCl₄ – на второй неделе. Восьмая группа мышей получала CCl₄ внутрибрюшинно. Девятая группа получала только масло *N. sativa*, а десятая – только масло *S. officinalis*. Одиннадцатая группа получала КЖ *T. asperellum* 551.

1.2.7.1. Биохимические параметры мышей. Функционирование печени определяли по содержанию белков (Ianculov I. et al., 2010), активности трансаминазы (Reitman S., Frankel S., 1957) и содержанию общего билирубина (Tietz U.M., 1983), - почек - по содержанию белков (Ianculov I. et al., 2010), мочевины (Eisenweiner H.G., 1976) и креатинина (Bartles H. et al., 1972; Larsen K. 1972).

1.2.7.2. Гематологические параметры мышей. Подсчитывали количество красных кровяных телец, уровень гемоглобина, гематокрит (объем форменных элементов крови), средний объем эритроцита (MCV), средний объем гемоглобина

(MCH) и средний размер гемоглобина в эритроците (MCHC) (Dacie S.J., Lewis S.M., 1991).

1.2.7.3. Гистологические параметры мышей стока CD-1 получавших тетрахлорметан. Гистологические препараты готовили по стандартной схеме (Коржевский Д.Э., Гиляров А.В., 2010).

1.2.8. Фунгистатическое и стимулирующее влияние биопрепаратов на кинетические и биохимические параметры микромицетов и растительный тест объект – кукуруза. Для изучения влияния на микромицеты использовали КЖ *T. asperellum* и масла *S. officinalis* и *N. sativa*, а для изучения влияния на растения - использовали КЖ *T. asperellum*, буферный экстракт из отходов производства фитопрепарата *N. sativa* и водного экстракта из отходов сухого сбора *S. officinalis*.

1.2.8.1. Определение удельной скорости роста микромицетов (Шишаков В.В., 2014). Удельную скорость роста микромицетов определяли по формуле:

$$\mu = \frac{2.3 (\log d_1 - \log d_0)}{t_1 - t_0}$$

Где: μ - удельная скорость роста, d_1 - диаметр колонии в конечное время, d_0 - диаметр колонии в начальное время, t_1 - конечное время, t_0 - начальное время.

1.2.8.2. Определение биохимических параметров: содержание фенолов (Amin I. et al., 2006), флавоноидов (Meda A. et al., 2005), белков (Ianculov I. et al., 2010), танинов (Makkar H.P. et al., 1993) и антиоксидантной активности (Priya M.G. et al., 2011). Хроматографический анализ методом гель-фильтрации на хроматографе ÄKTA™ avant 25, колонка Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция), определение ксиланазной целлюлазной и амилазной активности только в культуральном фильтрате микромицетов (König H.J. et al., 2006).

1.2.9. Методы приготовления биопрепаратов для изучения влияния на растения.

1.2.9.1. Приготовление буферного экстракта из отходов производства фитопрепарата из *N. sativa*. 5г отходов производства лекарств на основе семян *N. sativa*. К промытым отходам добавили 50 мл 100 мМ фосфатного буфера pH=7.4. Фосфатный буфер с семенами поставили на качалку (140 об. /мин) и качали при 37°C в течение 24 часов. Для получения экстракта из отходов семян с фосфатным буфером фильтровали через фильтровальную бумагу.

1.2.9.2. Приготовление водного экстракта *S. officinalis* из отходов сухого сбора. 5г отхода сухого сбора *S. officinalis* инкубировали при 100°C в 50 мл дистиллированной воды в течение 30 минут. После этого фильтровали экстракт с помощью фильтровальной бумаги.

1.2.9.3. Приготовление культуральной жидкости *T. asperellum* 551. Культуральную жидкость *T. asperellum* 551 готовили согласно технологии производства биофунгицида Фитотрикс (Ибатуллина Р.П., Алимова Ф.К., 2013).

1.2.10. Фитотоксичность метаболитов *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* 551. Семена кукурузы обработали культуральной жидкости *T. asperellum* 551, буферным экстрактом *N. sativa*, водным экстрактом *S. officinalis*. В течение 7 дней проводили измерения длины корней и проростков.

1.2.11. Получение гомогенатов проростков и корней кукурузы. Отделили части корней от проростков. 0.5 г. каждый образец растерли в ступке до гомогенного состояния с добавлением 5 мл 100 мМ фосфатного буфера pH=7.4. Гомогенаты

центрифугировали 30 минут при скорости 15000 об/мин, затем слили супернатант в чистые пробирки. Полученные гомогенаты использовали для дальнейших биохимических исследований.

1.2.12. Статистический анализ. Результаты представлены как среднее арифметическое со стандартным отклонением. Достоверность результатов определяли с использованием ANOVA. Уровень значимости, примененный в работе, $p < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Сравнительная цитотоксическая активность препаратов на основе *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в отношении непрерывно размножающихся и опухолевых клеточных линий Hek 293, HeLa и MCF-7 по сравнению с известным противоопухолевым препаратом на основе *N. sativa*.

Для решения прикладных задач в современной цитологии требуется оценка параметров клеток, которые определяют жизнеспособность их популяций (Герасимов И.Г., Попандопуло А.Г., 2007). В связи с этим, нами было изучено влияние растительных масел с известным противоопухолевым эффектом *N. sativa* в сравнении с малоизученными метаболитами *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 на жизнеспособность клеточных линий Hek 293, HeLa и MCF-7.

2.1.1. Определение средних токсических доз препаратов на основе *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в отношении непрерывно размножающихся и опухолевых клеток человека по сравнению с *N. sativa*.

С помощью МТТ-теста определяли ингибирующую концентрацию (IC_{50}) - концентрацию тестируемых веществ, вызывающих ингибирование пролиферации клеток на 50%. Через 72 часа культивирования средняя токсическая доза масла *N. sativa* для линий клеток Hek 293, HeLa и MCF-7 составила 14.04, 1.70, и 1.49 мг/мл соответственно, средняя токсическая доза масла *S. officinalis* для тех же клеток составила 17.07, 5.66, и 0.68 мг/мл соответственно, а средняя токсическая доза КЖ *T. asperellum* 551 для исследуемых клеток составила 15.94, 8.64, и 0.70 мг/мл (Рис. 1).

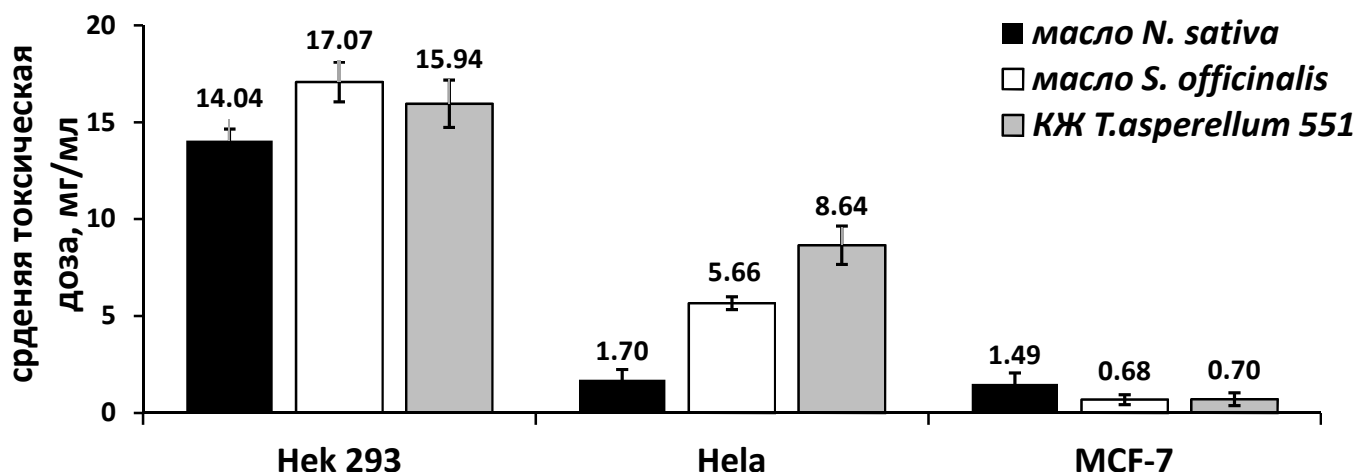


Рис.1. Средняя токсическая доза (мг/мл) масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 в отношении клеток Hek 293, HeLa и MCF-7 в течении 72 часов культивирования.

Таким образом, выявлено значение IC_{50} относительно клеточных линий MCF-7 и HeLa у КЖ *T. asperellum* 551 и масла *S. officinalis*, по сравнению с маслом *N. sativa*. Полученные результаты, указывают на то, что масла *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 - не оказывают токсическое действие на клетки линии Hek 293. Наибольшая токсичность показана для масла *N. sativa* в отношении клеток HeLa по сравнению с маслом *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551. Наименьшая токсичность к клеткам HeLa выявлена у *T. asperellum* 551 (Рис. 1).

2.1.2. Влияние масла *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на морфологию неперерожденных и опухолевых клеток человека по сравнению с *N. sativa*.

Известно, что внешний вид клетки может дать различную информацию о ней, в том числе о внутриклеточной структуре и содержании различных веществ (Герасимов И.Г., Попандопуло А.Г., 2007). Поэтому нами было изучено действие исследуемых масел и КЖ *T. asperellum* 551 на морфологию клеток. Изучая изменения в морфологии, обращали особое внимание и на состояние межклеточных контактов. Изменение в морфологии при обработке клеток маслами *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 носит концентрационно зависимый характер. При всех видах обработки наблюдалось увеличение межклеточных контактов, так же изменялась степень адгезии клеток к поверхности планшета (Рис. 2 и 3).

Согласно результатам эксперимента, под воздействием масел *N. sativa*, *S. officinalis* и метаболитов *T. asperellum* 551 клетки Hek 293 не претерпевают значительных морфологических изменений, что указывает на их биобезопасность.

При обработке клеток линии HeLa исследуемыми маслами, наблюдается изменение морфологии клеток: клетки округляются и уменьшаются в размерах, пропадают межклеточные контакты, клетки обособляются. При обработке клеток HeLa КЖ *T. asperellum* 551 в концентрации 20 мг/мл и 100 мг/мл можно отметить, что с увеличением концентрации КЖ *T. asperellum* 551 происходит потеря контактов между клетками, они обособляются, также приобретают округлую форму. Наблюдается деградация клеточных мембран. (Рис.2). Кроме того, при обработке клеток линии MCF-7 маслом *N. sativa* происходит увеличение размеров клеток с появлением различных нехарактерных выростов мембраны (Рис.3). При концентрации *N. sativa* выше 80 мг/мл происходит уменьшение размеров и гибель клеток. Масло *S. officinalis* оказывает губительное воздействие уже при концентрации 60 мг/мл, в этом случае клетки округляются, отсоединяются от дна лунки планшета и плавают в толще среды (Рис.3). При обработке клеток MCF-7 КЖ *T. asperellum* 551 в концентрации 60 и 80 мг/мл, с увеличением концентрации уменьшается объем клеток, происходит потеря контактов между ними. Клетки приобретают округлую форму. Наблюдается деградация клеточных мембран (Рис.3).

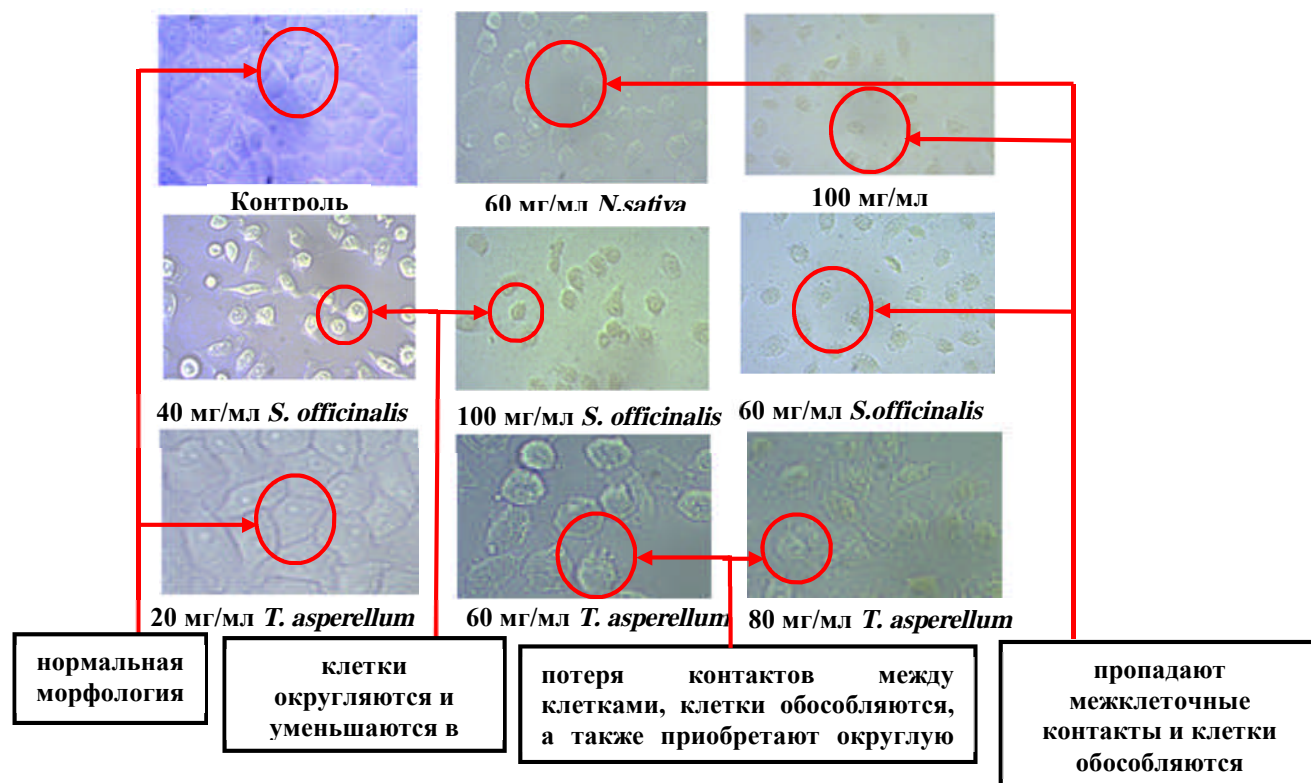


Рис.2. Морфологические изменения в клетках HeLa под воздействием различных концентраций *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в течение 24 часов культивирования X200.

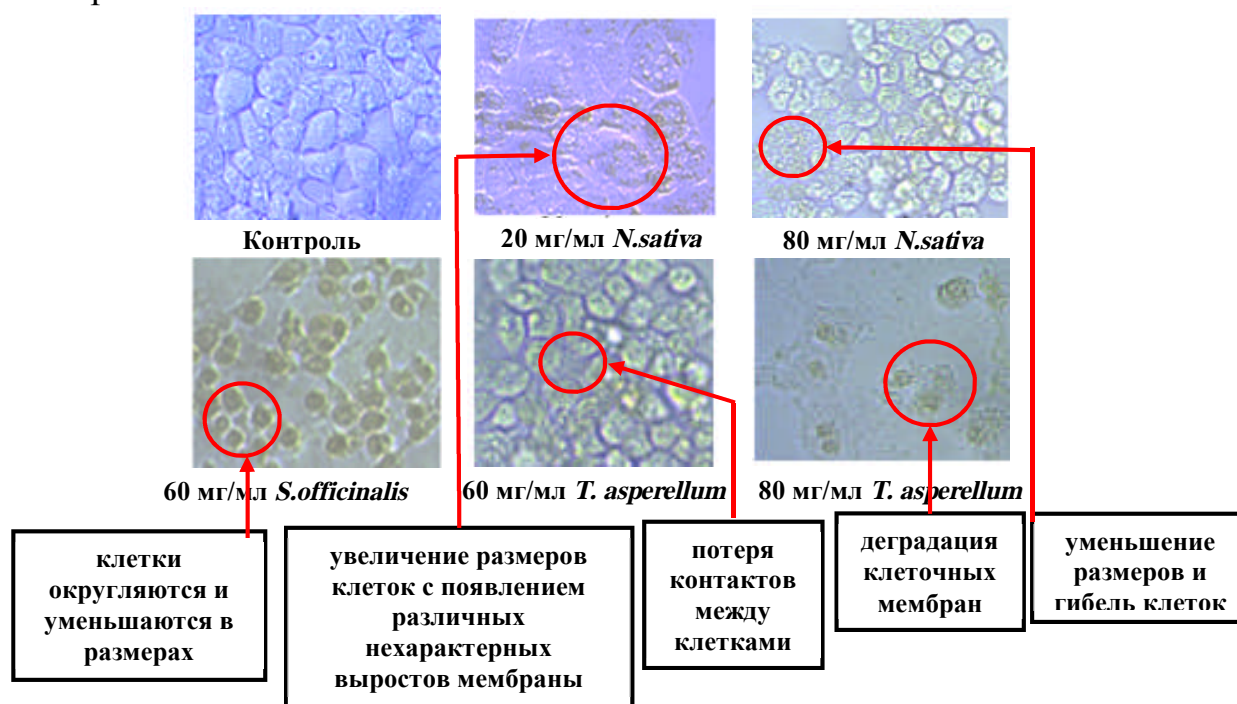


Рис.3. Морфологические изменения в клетках MCF-7 под воздействием различных концентраций *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 в течение 24 часов культивирования X200.

2.1.3. Влияние масла *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на мембранный потенциал митохондрий неперерожденных и опухолевых клеток человека по сравнению с маслом *N. sativa*.

Апоптоз играет центральную роль в регуляции гомеостаза нормальной ткани и принимает участие в устранении потенциально опасных клеток, в том числе и предшественников опухолевых клеток (Evan G.I., Vousden K.H., 2001). Митохондрии играют важную роль в регуляции процесса апоптоза. В частности, на ранних стадиях апоптоза наблюдается выделение нескольких белков, в том числе цитохрома-с и апоптоз-индуцирующих факторов, обычно расположенных в межмембранном пространстве (Hengartner M.O., 2000). В эксперименте оценивалось действие исследуемых препаратов на мембранный потенциал митохондрий клеток. Согласно результатам эксперимента, процентное содержание апоптотических клеток Нек 293 в контрольном образце составило 18.65 % (Рис. 4А). Наибольшей апоптотической активностью относительно клеток Нек 293 обладает масло *S. officinalis* (содержание негативных по TMRE клеток 22.25%) (Рис. 4В). При обработке маслом *N. sativa* и метаболитов КЖ *T. asperellum* 551 содержание апоптотических составило 19.86 и 21.38 % соответственно (Рис. 4 Б, Г). Кроме того, было показано, что в контрольной пробе HeLa – содержание апоптотических клеток составило 24.12% (Рис. 5А). Наибольшей апоптотической активностью относительно клеток HeLa обладает масло *S. officinalis* – содержание негативных по TMRE клеток в пробе составило 64.90% (Рис. 5В). Процент апоптотических клеток при обработке маслом *N. sativa* и метаболитов КЖ *T. asperellum* 551 составил 59.50 и 53.50% соответственно (Рис. 5 Б, Г). В контрольной пробе MCF-7 – клетках без обработки содержание апоптотических клеток составило 22.63% (Рис. 6А). Наибольшей апоптотической активностью относительно клеток MCF-7 обладает масло *S. officinalis* – процент негативных по TMRE в пробе составил 37.42% (Рис. 6В). Процент апоптотических клеток при обработке маслам *N. sativa* и КЖ *T. asperellum* 551 составил 28.23 и 28.36 % (Рис. 6 Б, Г).

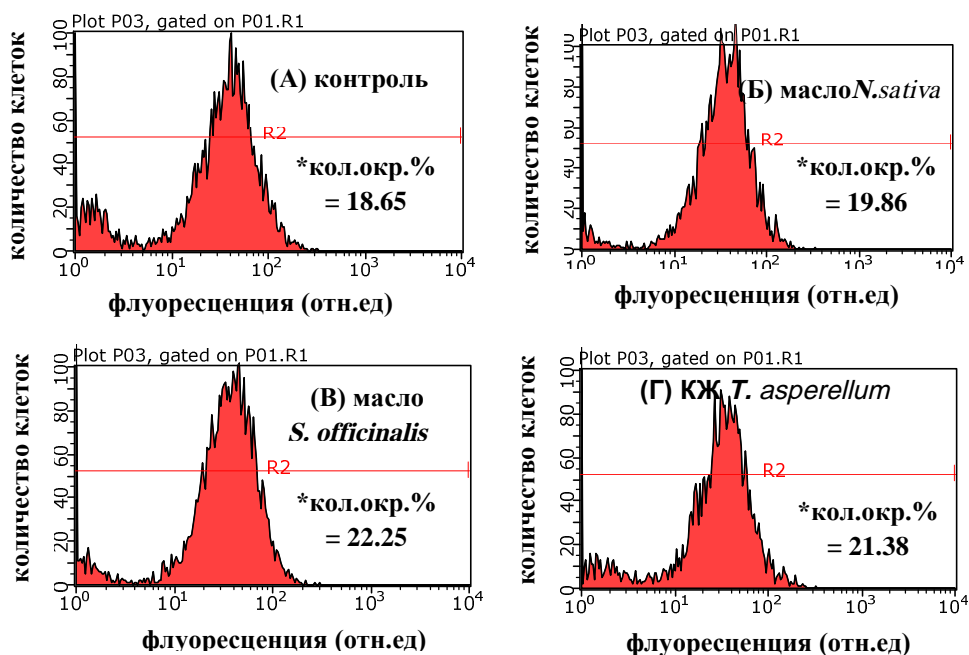


Рис.4. Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках Нек 293 после культивирования с различными концентрациями *N.sativa* (Б), *S. officinalis* (В) и *T. asperellum* 551 (Г). *Указаны количество клеток, окрашенных TMRE в процентах.

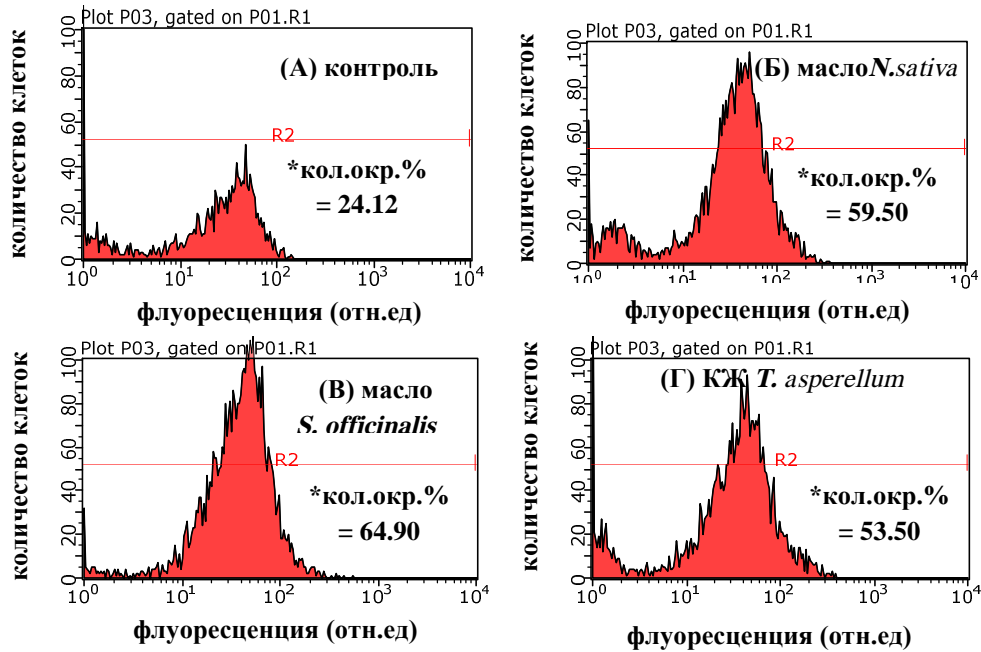


Рис.5. Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках HeLa после культивирования с различными концентрациями *N.sativa* (Б), *S. officinalis* (В) и *T. asperellum* 551 (Г). *Указаны количество клеток, окрашенных TMRE в процентах.

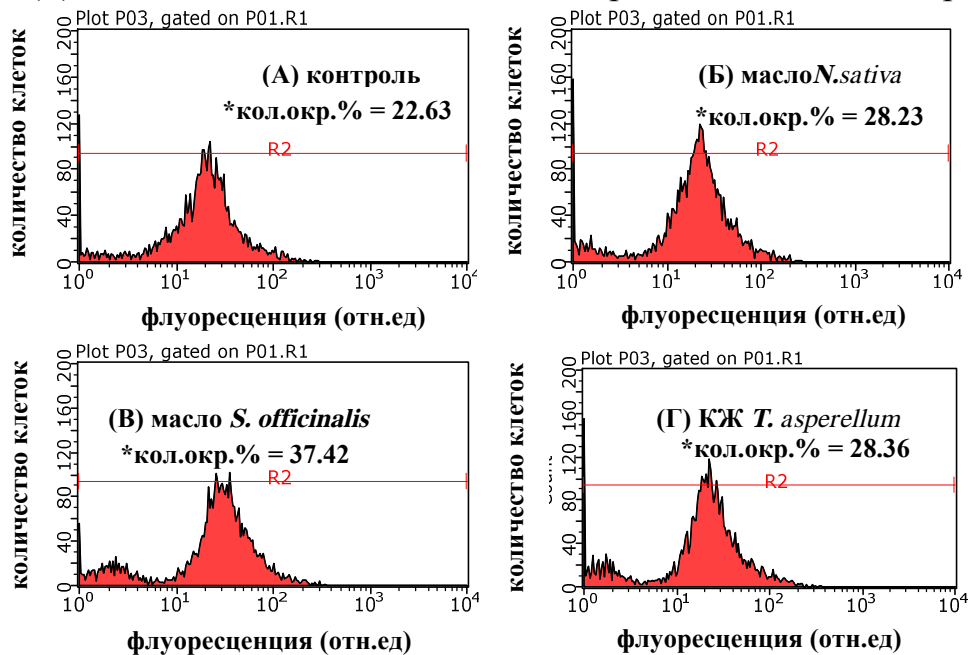


Рис.6 Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках MCF-7 после культивирования с различными концентрациями *N.sativa* (Б), *S. officinalis* (В) и *T. asperellum* 551 (Г). *Указаны количество клеток, окрашенных TMRE в процентах.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что тестируемые препараты – масла *N. sativa* и *S. officinalis*, а также КЖ *T. asperellum* 551 – вызывают процесс апоптоза в опухолевых клетках HeLa и MCF-7 и не оказывают токсическое действие на в неперерожденные клетки Нек 293. Известно, что большая часть лечебных свойств *N.sativa* проявляется благодаря наличию тимохинона, главного биологически активного компонента эфирного масла (Вамоса А., 2014). Тимохинон вызывает р53-независимый апоптоз через активацию каспаз, в частности, каспазы-3 и -8, а также изменение митохондриальных событий в р53-нулевых HL-60 клеток

миелобластного лейкоза. Кроме того, например, обработка HL-60 клеток тимохиноном вызвала заметное увеличение коэффициента Вах/BC12 за счет увеличения Вах и снижения экспрессии BC12 белков (EL-Mahdy M.A. et al., 2005). Вероятно, такой же механизм индукции апоптоза опухолевых клеток отмечен у клеток HeLa и MCF-7 под влиянием КЖ *T. asperellum* 551, т.к. у последнего также доказана способность к синтезу тимохинона. Механизм противоопухолевого действия масла *S. officinalis* не известен. Таким образом, регистрация явления апоптоза, в большей степени у клеток MCF-7, позволило предположить наличие у масла *S. officinalis* и метаболитов *T. asperellum* 551 противоопухолевого эффекта аналогичного - маслу *N. sativa*. Отсутствие апоптоза у неперерожденных клетках Нек 293 указывает на биобезопасность исследуемых препаратов (Рис. 4,5 и 6). Нами показано отсутствие содержания микотоксинов и наличие лектинов у *T. asperellum* 551, что дает вероятно указывает на причину отсутствия токсического действия на клетки Нек 293 и токсического - на опухолевые. Данные представляют особенный интерес, поэтому требуются дальнейшие исследования для потенциального применения этих препаратов для лечения различных заболеваний, в том числе и опухолевых.

2.2. Влияние препаратов на основе *S. officinalis* *T. asperellum* 551 на биохимию и морфологию органов лабораторных мышей, получавших тетрахлорметан по сравнению с действием *N. sativa*.

Несмотря на то, что различными авторами накоплено большое количество данных о разнонаправленном действии масел *N. sativa*, *S. officinalis* и метаболитов КЖ *Trichoderma* вопрос об их влиянии на важные показатели организма остается недостаточно изученным (Gupta et al., 2014; Al-Sheddi E.S. et al., 2014).

Известно, что тетрахлорметан (CCl₄) является сильным гепатотоксином, который, в первую очередь, поражает печень и почки (Khalaf A.A. et al., 2009). Поэтому нами было изучено влияние препаратов на основе *S. officinalis* *T. asperellum* 551 по сравнению с *N. sativa* на биохимические параметры печени и почек мышей получавших тетрахлорметан.

2.2.1. Влияние препаратов на основе *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 на биохимические параметры печени и почек по сравнению с *N. sativa*.

Было протестировано действие тетрахлорметана и масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на основные показатели функционирования печени, а именно, активность аспартатаминотрансферазы и аланинтрансаминазы, а также концентрацию билирубина в сыворотке крови. Согласно результатам эксперимента мыши, подвергавшиеся действию тетрахлорметана, имели высокий уровень трансаминаз и общего билирубина, что говорит об интоксикации организма и ухудшении работы печени (Табл.1). Введение мышам масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 до или после тетрахлорметана оказывает благоприятное действие на функционирование печени, что, вероятно, объясняется активацией защитных механизмов, которые могут происходить, либо в результате индукции генов некоторых защитных ферментов, либо путем инактивации CYP2E1 (Takahashi S. et al., 2002). В таблице 2 представлены данные о влиянии исследованных препаратов на состояние почек мышей (содержание креатинина и мочевины). Согласно результатам эксперимента, было отмечено достоверное увеличение

концентрации мочевины и креатинина при обработке тетрахлорметаном, что указывает на дисфункцию почек (Табл. 2). Таким образом, тетрахлорметан оказывает резко токсическое действие на печень и почки мышей, вызывая их дисфункцию. После введения масел *N.sativa*, *S.officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 наблюдается тенденция к восстановлению работы почек. В группах 9, 10 и 11, где мыши получали только масло *N.sativa* или *S.officinalis* или КЖ *T. asperellum* 551, нарушения работы почек не выявлены.

Таблица 1

Влияние масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на основные показатели функционирования печени мышей стока CD-1 получавших тетрахлорметан

Вариант	Основные показатели печени		
	АлАТ, ед./л \pm SD	АсАТ, ед./л \pm SD	Общий билирубин (мг %) \pm SD
Группа 1 (Контроль)	45.20 \pm 1.90	53.20 \pm 3.84	0.37 \pm 0.30
Группа 2 (CCl ₄ + NS)	47.22 \pm 4.00	56.42 \pm 12.40	0.32 \pm 0.18
Группа 3 (CCl ₄ + SO)	45.00 \pm 4.44	49.50 \pm 4.44	0.38 \pm 0.12
Группа 4 (CCl ₄ + КЖ)	45.56 \pm 2.22	49,50 \pm 2.22	0.38 \pm 0.11
Группа 5 (NS + CCl ₄)	50.22 \pm 9.80	58.22 \pm 12.16	0.41 \pm 0.10
Группа 6 (SO + CCl ₄)	53.42 \pm 12.40	61.22* \pm 5.78	0.36 \pm 0.12
Группа 7 (КЖ + CCl ₄)	55.55 \pm 6.20	61.22* \pm 2.89	0.39 \pm 0.16
Группа 8 (CCl ₄ +)	119.20* \pm 7.96	171.05* \pm 3.86	5.22 \pm 2.48
Группа 9 (NS +)	45.50 \pm 4.56	53.80 \pm 7.36	0.40 \pm 0.24
Группа 10 (SO +)	46.20 \pm 7.56	55.20 \pm 2.40	0.42 \pm 0.18
Группа 11 (КЖ +)	47.73 \pm 2.11	54.12 \pm 4.00	0.44 \pm 0.09

* Значимо отличаются от контроля ($p < 0.05$).

Таблица 2

Влияние масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на основные показатели функционирования почек мышей стока CD-1 получавших тетрахлорметан

Вариант	Основные показатели почек	
	Мочевина (мг%) \pm SD	Креатинин (мг%) \pm SD
Группа 1 (Контроль)	25.22 \pm 4,16	0.63 \pm 0.26
Группа 2 (CCl ₄ + NS)	26.33 \pm 2,30	0.62 \pm 0.20
Группа 3 (CCl ₄ + SO)	26.15 \pm 1,80	0.64 \pm 0.40
Группа 4 (CCl ₄ + КЖ)	25.15 \pm 1.91	0.65 \pm 0.13
Группа 5 (NS + CCl ₄)	26.12 \pm 3.88	0.61 \pm 0.24
Группа 6 (SO + CCl ₄)	25.98 \pm 5.48	0.62 \pm 0.28
Группа 7 (КЖ + CCl ₄)	26.12 \pm 1.74	0.63 \pm 0.25
Группа 8 (CCl ₄ +)	58.42* \pm 6,04	2.12* \pm 0.48
Группа 9 (NS +)	25.12 \pm 2,28	0.66 \pm 0.62
Группа 10 (SO +)	26.12 \pm 5,8	0.65 \pm 0.24
Группа 11 (КЖ +)	26.15 \pm 2.97	0.64 \pm 0.10

* Значимо отличаются от контроля ($p < 0.05$).

Таким образом, исследуемые препараты, по данным изменения биохимических показателей, вероятно, могут аттенуировать токсическое действие тетрахлорметана. Гепатопротекторным действием после воздействия токсинов обладают все

исследуемые препараты в равной степени. Следует отметить, что введение масел *N.sativa* или *S.officinalis* или КЖ *T. asperellum* 551 смягчает влияние тетрахлорметана на функционирование почек и печени мышей, что указывает на их гепатопротекторное действие. Использование масел или КЖ *T. asperellum* 551 до введения тетрахлорметана не вызывало ожидаемого профилактического эффекта, возможно, это связано со спецификой действия метаболитов, содержащихся в исследуемых препаратах.

2.2.2. Влияние препаратов на основе *S. officinalis* и *T. asperellum* 551 на гистологию печени мышей, получавших тетрахлорметан по сравнению с *N. sativa*.

На фотографии среза печени контрольной мыши хорошо видно компактное расположение гепатоцитов, они неправильной многоугольной формы, имеют нормальную клеточную архитектуру, у нормальных гепатоцитов в клетках с хорошо сохранившейся цитоплазмой видны ядро, и ядрышко (Рис 7А). После воздействия тетрахлорметана обнаружены некоторые повреждения клеток и центродолевого затора, нет инфильтрации воспалительных клеток, увеличилась митотическая активность, обнаружен интенсивный нейтральный инфильтрат, обширное жировое перерождение и тяжелый центродолевой некроз (Рис. 7Б).

У мышей, получавших в качестве терапии масло *N. sativa*, *S. officinalis* и комплекс метаболитов КЖ *T. asperellum* 551 после тетрахлорметана обнаружено улучшение в ткани печени и заметна умеренная степень жировых изменений, повреждение ткани и некроз были выражены в меньшей степени, чем в группе с CCl_4 . (Рис. 7Г, Д). Кроме того, нет расстройства и заметны нормальные печеночные пластинки (Рис. 7В) и нормальная клеточная архитектура (Рис. 7 Д). Данные проведенного исследования подтверждают результаты, полученные Khalaf A.A. et al., (2009)

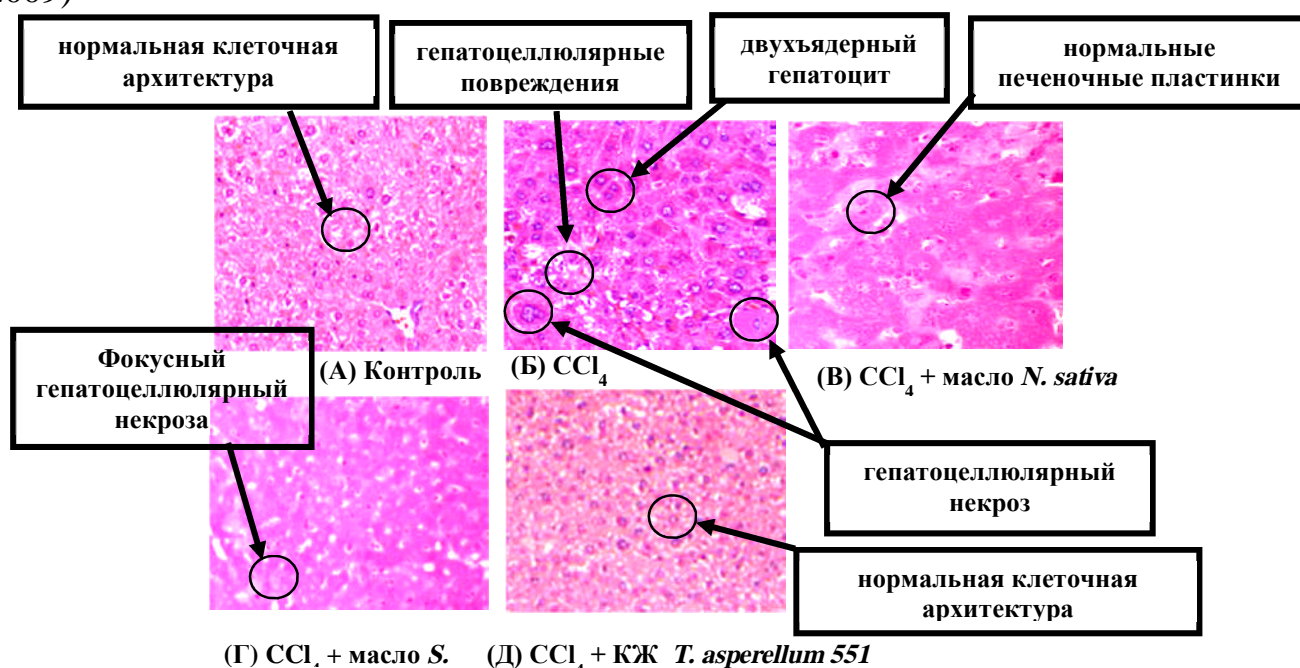


Рис.7. Влияние *N. sativa*, *S. officinalis*, *T. asperellum* 551 и тетрахлорметана на гистологию печени x100.

Тетрахлорметан рассматривается как гепатотоксин, действующий напрямую на печень и приводящий к лобулярному некрозу и стеатозу. Механизм печеночных повреждений тетрачлорметаном включает в себя перекисное окисление липидов мембран, связанных с жирными кислотами, которое приводит к разрушению клеточной мембраны и внутриклеточных органелл гепатоцитов (Adewale O.B. et al., 2014). Таким образом при исследовании влияния исследуемых препаратов на гистологию печени мышей, получавших тетрачлорметан, выявлено, что масло *N. sativa*, *S. officinalis*, а также КЖ *T. asperellum* 551 возвращают нормальную архитектуру тканей печени. При обработке мышей исследуемыми препаратами уменьшается количество двухъядерных гепатоцитов, сохраняется баночная структура ткани по сравнению с обработанной только тетрачлорметаном. Также, исследуемые препараты предотвращают воспалительные и некротические процессы в ткани печени, возвращая ее нормальную морфологическую структуру.

Полученные данные коррелируют с результатами предыдущего исследования, где было выявлено, что при применении жидкого препарата *T. asperellum* 551 в течение 7 дней после воздействия менее токсичного гепатоксина – пирена выявлена тенденция к восстановлению печеночной ткани: дольчатая структура органа восстанавливается; вокруг кровеносных сосудов заметны обширные участки пролиферирующих ярко окрашенных гепатоцитов, имеющих более плотную структуру (Абдельрахман А.А., 2011). Таким образом гематологические исследования подтвердили гепатопротекторный эффект исследуемых препаратов.

2.3. Фунгистатическая активность препаратов на основе масел *N. sativa* и *S. officinalis* по данным изменения физиологических и биохимических параметров в отношении патогенных и фитопатогенных грибов по сравнению с известным фунгицидом на основе *T. asperellum* 551.

Фармацевтический и сельскохозяйственный рынки испытывают дефицит эффективных фунгистатических препаратов. Нами исследовалось влияние препаратов на возбудителей аспергилеза- *A. niger*, *A. flavus* и возбудитель фузариоза *F. oxysporum*. В работе также изучалось влияние на вид *A. awamori*, используемый как модельный при работе с патогенами. Патогенные виды являются причиной микозов, аллергии и других заболеваний человека. Известно, что фитопатогенные микромицеты инфицируют многие растения и, таким образом, влияют на рост и продуктивность растения на всех стадиях развития. Они выделяют много токсинов в пищу и кормах. Для снижения уровня их токсинов, а также разрушения токсинов в пище и кормах используются разные физические, химические и биологические методы для предотвращения роста этих грибов (Thanaboripat D., 2002, Drizhinina I.S. et al., 2011). Препараты на основе *Trichoderma* хорошо известны как фунгистатические и фунгицидные препараты, широко используемые в агробиотехнологии как альтернатива пестидам (Алимова 2006, Ибатуллина Р.П., Алимова Ф.К., 2013). В литературе появились данные о возможном фунгистатическом эффекте масел *N. sativa* и *S. officinalis* (Aljabre S.H. et al., 2005; Khalil R., Li Z., 2011).

2.3.1. Влияние масел *N. sativa* и *S. officinalis* на физиологические параметры патогенных и фитопатогенных грибов по сравнению с влиянием *T. asperellum* 551.

Способность к росту является одним из основных свойств микроорганизмов. Удельная скорость роста является одним из важных физиологических параметров микроорганизмов. Для изучения влияния масел *N. sativa*, *S. officinalis* и культуральной жидкости *T. asperellum* 551 на физиологические параметры микромицетов нами была исследована удельная скорость роста патогенных штаммов *A. niger*, *A. flavus* и фитопатогенного штамма *F. oxysporum*, которые были обработаны в разных вариантах маслами и *T. asperellum* 551. Как показано на рисунке 8 А, Б, В и Г скорость роста *A. niger*, *A. flavus*, *A. awamori* и *F. oxysporum* снизилась на 86, 75, 84 и 85% соответственно по сравнению с контролем после обработки маслом *N. sativa* и *S. officinalis* в течение 168 часов инкубации при 28⁰С. А после обработки КЖ *T. asperellum* 551 скорость роста данных патогенных грибов снизилась на 75, 25, 67 и 68% соответственно по сравнению с контролем. Кроме того, следует заметить, что на данном рисунке видно, что, максимальная скорость роста *A. awamori* была зарегистрирована после 72ч инкубации (Рис. 8В), а максимальная скорость роста *A. niger*, *A. flavus* и *F. oxysporum* было отмечена после 24ч инкубации (Рис. 8 А, Б и Г).

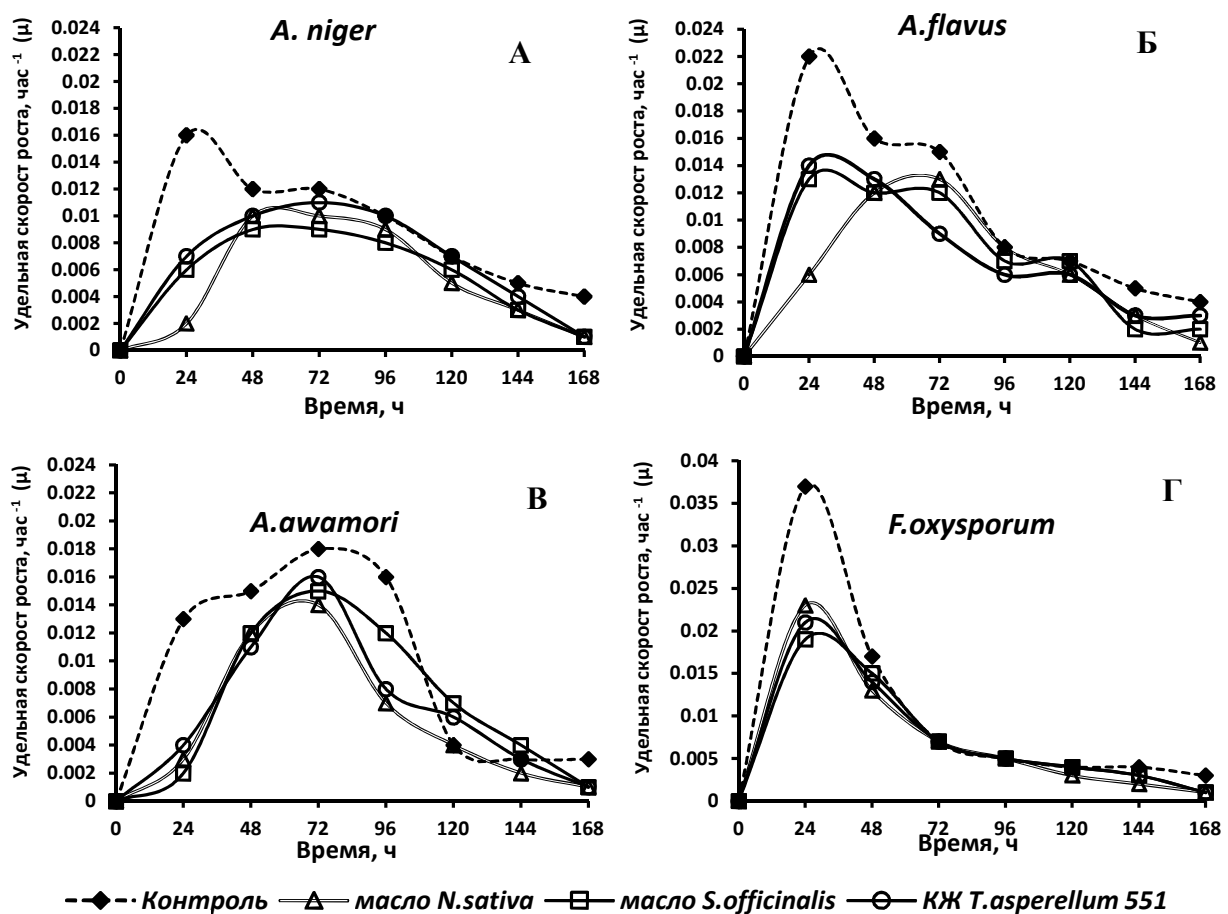


Рис.8. Влияние масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на удельную скорость роста *A. niger* (А); *A. flavus*; (Б); *A. awamori*; (В) и *F. oxysporum* (Г).

Отмеченное нами ингибирование роста тестируемых микромицетов, вероятно, связано с содержанием в маслах *N. sativa* и *S. officinalis* фунгистатических веществ типа сесквитерпеновых лактонов и α -терпинен соответственно (Байкова Е.В. и др., 2002).

Фунгистатическое действие *T. asperellum* связано с содержанием комплекса соединений с антибиотическим типом действия типа пептаиболов, белка параселсина, трихотецина, триходермина, глиотоксина, виридина, вортманина и других (Shi M. et al., 2010). Самоактивируемый виридин является пролекарством, медленное высвобождение и, цитотоксическое действие которого, как предполагают, могут быть полезны в химиотерапии (Smith R. et al., 2009). Цитотоксическая активность глиотоксина, как правило, опосредована прямой инактивацией тиолов белка (Hurne A. et al., 2000). Анализ результатов проведенных исследований показывает, что масла *N. sativa* и *S. officinalis* обладают большей способностью к снижению удельной скорости роста патогенных и фитопатогенных микромицетов, чем КЖ *T. asperellum* 551. Поведение модельного микромицета *A. awamori* совпадает с чувствительностью патогенных видов *A. niger* и *A. flavus* (Рис. 8).

2.3.2. Влияние масел *N. sativa*, *S. officinalis* на биохимические параметры патогенных и фитопатогенных грибов по сравнению с влиянием *T. asperellum*.

Для подробного изучения механизма фунгистатического действия масел *N. sativa* и *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 нами было изучено изменение содержания белков, фенолов, флавоноидов и танинов, а также антиоксидантной активности в культуральной жидкости тестируемых микромицетов (Рис.9).

Обработка маслом *N. sativa* на 25 и 40% увеличивает содержание белка в культуральной жидкости *A. flavus* и *A. awamori*, обработка маслом *S. officinalis* - на 30% у *A. awamori*, обработка КЖ *T. asperellum* 551 - на 49 и 54% у *A. niger* и *F. oxysporum* соответственно и снижает действие последнего на 38% у *A. awamori* (Рис. 9А). Результаты нашего исследования также показали, что обработка маслом *N. sativa* на 44% увеличивает содержание фенолов в культуральной жидкости у *A. niger*, маслом *S. officinalis* - на 11% у *A. flavus*. После обработки КЖ *T. asperellum* 551 содержание фенолов в культуральной жидкости на 42% снижалось у *A. flavus* (Рис. 9Б). В данной работе показано, что после обработки маслом *N. sativa* содержание флавоноидов в культуральной жидкости увеличивается на 82% у *A. awamori*, после обработки маслом *S. officinalis* - на 52 и 38% у *A. awamori* и *F. oxysporum* соответственно, после обработки КЖ *T. asperellum* 551 - на 35% у *A. flavus* (Рис. 9В).

При изучении влияния исследуемых препаратов на содержание танинов было отмечено при обработке маслом *N. sativa* увеличение на 63% содержания танинов в культуральной жидкости *A. awamori*, под воздействием *T. asperellum* 551 - на 41 и 28% в культуральной жидкости *A. niger* и *F. oxysporum* соответственно (Рис. 9Г).

Кроме того, обработка маслом *N. sativa* и КЖ *T. asperellum* 551 увеличивает антиоксидантную активность культуральной жидкости *A. niger* на 20% и 17% соответственно, обработка маслом *S. officinalis* практически полностью ингибирует антиоксидантную активность этого гриба. Обработка маслами *N. sativa* или *S. officinalis* увеличивает антиоксидантную активность в культуральной жидкости *A. flavus* на 15%, а обработка *T. asperellum* 551 - на 17%.

По данным биохимического анализа поведение модельного микромицета *A. awamori* более чувствительно по сравнению с патогенными видами *A. niger* и *A. flavus* и его реакция на фунгистатические вещества не отражают полностью реакцию патогенных микромицетов.

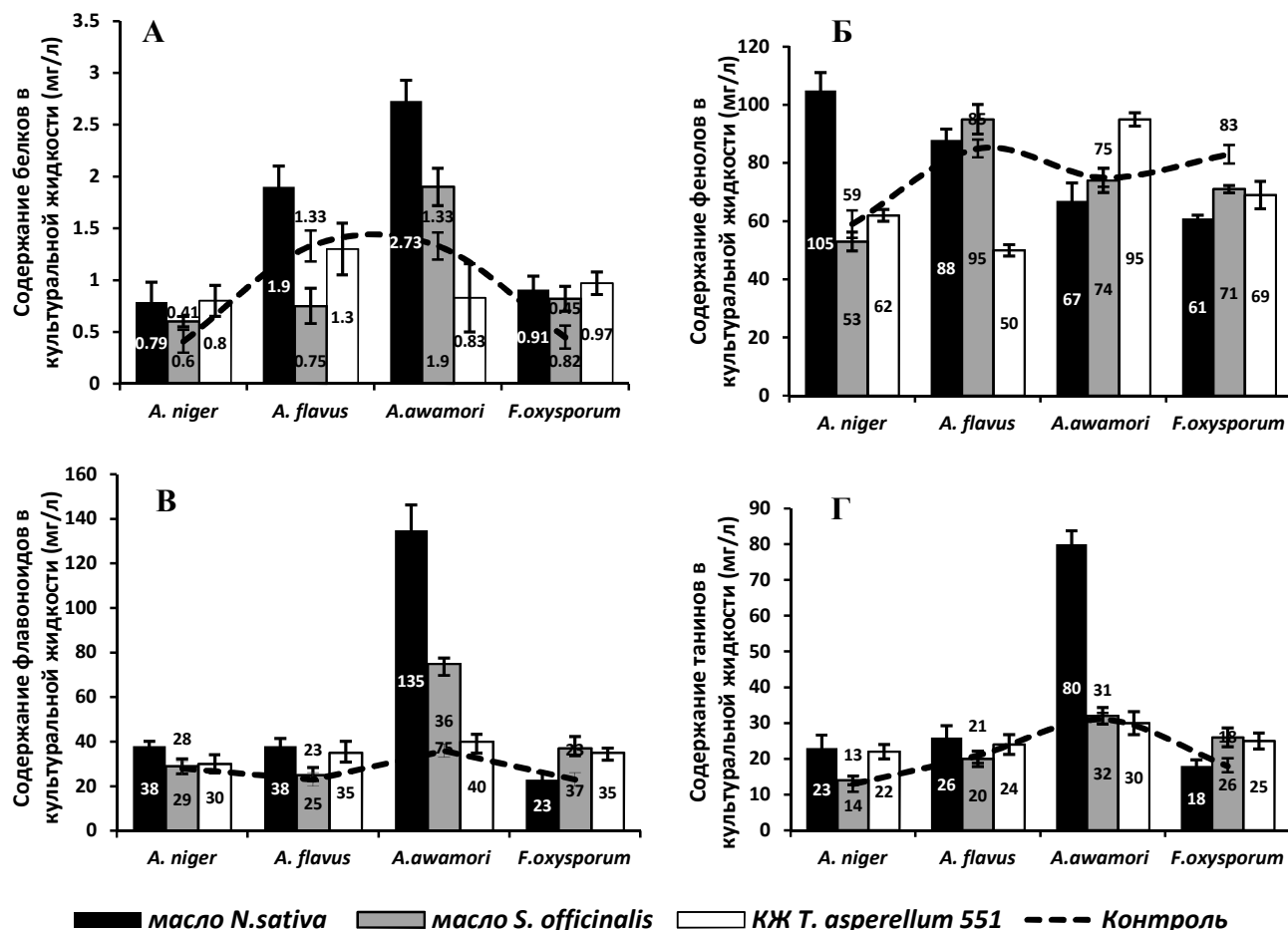


Рис.9. Влияние масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 на содержание белков (А), фенолов (Б), флавоноидов (В) и танинов (Г) в культуральной жидкости фитопатогенных грибов.

Масло *N. sativa* оказывает больший эффект по сравнению с маслом *S. officinalis* и культуральной жидкостью *T. asperellum* 551 на выработку метаболитов тестируемыми микромицетами. Кроме того, при исследовании влияния исследуемых препаратов на антиоксидантную активность культуральной жидкости патогенных и фитопатогенных микромицетов было отмечено увеличение выделения в культуральную жидкость *A. flavus* и *A. niger* соединений, перспективных в качестве противоопухолевых средств. Производство любых биопрепаратов, как правило, сопряжено с накоплением отходов, которые также могут представлять экономический интерес, в частности для агробιοтехнологии, по аналогии с биопрепаратом Фитотрикс на основе *Trichoderma*, который может иметь как медицинское, так и сельскохозяйственное значение.

2.4. Влияние метаболитов *N. sativa*, *S. officinalis*, полученных на основе отходов производства лекарств, на растение (фитотоксичность) по сравнению с влиянием *T. asperellum*.

В качестве тест объекта использовали кукурузу, которая является важнейшей культурой в России. Актуальной является задача по разработке биопрепаратов для защиты, увеличения роста и продуктивности кукурузы (Лукаткин А.С. и др., 2013).

Хорошо известны положительные результаты по использованию в растениеводстве биопрепаратов на основе *Trichoderma*. В связи с этим была произведена оценка влияние исследуемых биопрепаратов на основе *N. sativa*, *S. officinalis* на физиологические и биохимические параметры кукурузы по сравнению с влиянием *T. asperellum*.

2.4.1. Влияние метаболитов *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* на физиологические параметры кукурузы.

Нами была произведена оценка динамики развития проростков кукурузы двух сортов: Краснодарский 194 и Поволжский 188, обработанные культуральной жидкостью *T. asperellum* 551, экстрактами *S. officinalis* и *N. Sativa* (контроль-КГ среда, вода и фосфатный буфер). Фитотоксический эффект экстракта *N. sativa* на рост проростков и корней кукурузы составил 80% (Рис. 10А и Б).

Обработка семян кукурузы экстрактом *S. officinalis* значительно ($P \leq 0.05$) увеличивает длину корней и проростков кукурузы обоих сортов в равной степени (на 45%) и высоту растений, в большей степени Поволжского сорта (на 30%). Стимулирование длины корней и проростков кукурузы культуральной жидкостью *T. asperellum* 551 уступает по эффективности экстракту *S. officinalis* ($P \leq 0.05$).

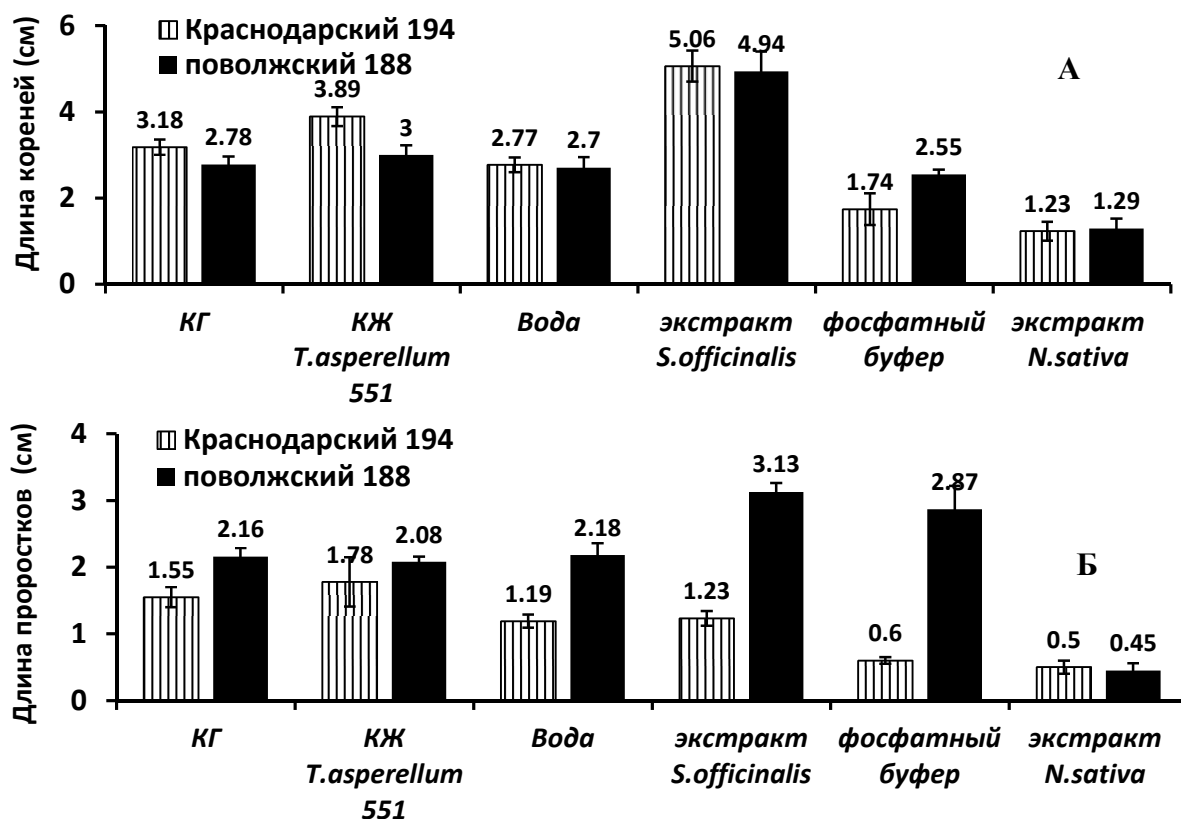


Рис.10. Влияние культуральной жидкости *T. asperellum* 551, экстрактов *N. sativa* и *S. officinalis* на длину корней (А) и проростков кукурузы (Б).

2.4.2 Влияние метаболитов *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* на содержание белков, флавоноидов, танинов и фенолов в корнях и проростках кукурузы.

Исследуемые биохимические показатели использовались для выяснения механизма действия на растения. Экстракты *N. sativa* ингибируют исследуемые физиологические и биохимические параметры кукурузы. Под действием экстракта *S. officinalis* содержание белков в корнях и проростках увеличивалось в среднем на 27%, фенолов - в корнях и проростках на 40% и 49% соответственно, флавоноидов – в корнях и в проростках на 65% и 78% соответственно, танинов – в корнях и в проростках на 29% и 80% соответственно, антиоксидантная активность увеличилась в корнях и проростках в среднем на 35%. Положительное действие водных экстрактов *S. officinalis* сопоставимо с положительным действием биопрепарата на основе *T. asperellum*. Показано комплексное положительное влияние на кукурузу водного экстракта отходов производства лекарственных средств из *S. officinalis*, оказывающего не только стимулирующее действие, но и улучшающее питательную ценность и другие важные биохимические характеристики растения. Таким образом, выявлены новые характеристики для лекарственных препаратов на основе масел *N. sativa*, *S. officinalis* и *T. asperellum* 551, что позволит расширить спектр их применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов подтвердили терапевтическое, гепатопротекторное и противоопухолевое действие масла *N. sativa*, а также выявили новые характеристики для биопрепаратов на основе масла *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551. Нами было показано, что комплексы метаболитов *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 способствуют нивелированию гепатотоксического действия тетрахлорметана на организм мышей и оказывают цитотоксическое действие в отношении раковых клеток Hela, MCF-7, восстанавливают основные биохимические показатели печени и почек у мышей. Отсутствие цитотоксического действия на клетки Нек 293 подтвердило их биобезопасность. На основании кинетических и биохимических параметров выявлено фунгистатическое действие метаболитов масел *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 в отношении патогенных (*A. niger* и *A. flavus*) и фитопатогенных (*F. oxysporum*) микромицетов. Исследована возможность использования не только самих лекарственных средств на основе растительных масел, но и отходов их производств. Показана перспективность использования водных экстрактов отходов производства лекарственных препаратов из *S. officinalis* в агробиотехнологии для защиты и повышения урожайности кукурузы. Эффективность последнего сопоставима с известным биопрепаратом Фитотрикс на основе *Trichoderma*. В дальнейшем требуются исследования по выделению конкретных метаболитов *N. sativa*, *S. officinalis* и КЖ *T. asperellum* 551 для изучения механизма их действия и получения новых лекарственных препаратов.

Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие основные выводы:

1. Показано, что растительные экстракты *S. officinalis* и метаболиты *T.asperellum* 551 оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки линии HeLa и MCF-7, и безопасны для клеточных линий Нек293 и сопоставимы с действием противоопухолевого препарата на основе *N. sativa*.
2. Установлено, что масла *S. officinalis* и метаболиты *T.asperellum* 551 аттенуируют гепатоканцерогенную активность гепатотоксина тетрахлорметана и восстанавливают нормальные биохимические, гематологические и гистологические показатели у мышей стока CD-1 в опытах *in vivo* аналогично с действием масел *N. sativa*.
3. Установлена фунгистатическая активность экстрактов *N. sativa*, *S. officinalis* аналогичная с действием биофунгицидов на основе *T.asperellum* 551 в отношении патогенных (*A. niger*, *A. flavus*) и фитопатогенных видов (*F.oxysporum*). Наибольшая эффективность в подавлении микромицетов выявлена у *N. sativa*.
4. Экстракты растительных отходов производства фитопрепарата из *S. officinalis* и биопрепарат на основе *T.asperellum* 551 стимулируют рост кукурузы и увеличивают содержание в них флавоноидов, танинов, белков и фенольных соединений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Эльшафей С.М.А. Влияние растительных масел *Nigella sativa* и *Salvia officinalis* на биохимические показатели мышей стока CD-1 / С.М.А. Эльшафей, А.А. Абдельрахман, Р.И. Тухбатова, Е.В. Иванова, Е.А. Акинина, Ю.Е. Воронкова, Л.С. Букуру, А.Н. Фаттахова, Ф.К. Алимова // Ученые записки Казанского Университета, Серия Естественные науки. –2013.–Т.155. –№ 3. – С. 82-89. (Список ВАК, РИНЦ– 0,030).
2. Эльшафей С.М.А. Изменение состава метаболитов *Trichoderma harzianum* и фитопатогенных грибов при воздействии масла шалфея лекарственного / С.М.А. Эльшафей, Т.А. Невзорова, А.А. Абдельрахман, Р.И. Тухбатова, С.С. Рябичко, Ф.К. Алимова // Фундаментальные исследования. –2014. – Т.8. –№ 3. – С. 646-650. (Список ВАК, РИНЦ– 0,296).
3. Эльшафей С.М.А. Влияние экстрактов *Nigella sativa* и *Salvia officinalis* на физиологические и биохимические показатели растений / С.М.А. Эльшафей, А.А. Абдельрахман, Е.А. Акинина, Р.И. Тухбатова, С.С. Рябичко, Ф.К. Алимова // Фундаментальные исследования. –2014. – Т.9. –№ 2.– С. 349-354. (Список ВАК, РИНЦ– 0,296).
4. Abd El-Rahman A.A. Cytotoxicity of *Trichoderma* spp. cultural filtrate against human cervical and breast cancer cell lines / A.A. Abd El-Rahman, S.M.A. El-Shafei, E.V. Ivanova, A.N. Fattakhova, A.V. Pankova, M.A. El-Shafei, E.A. El-Morsi, F.K. Alimova // Asian Pac J Cancer Prev.–2014.–V.15.-No.17. – P.7229-7234. (Список ВАК, Импакт-фактор JCR–1.5).
5. Эльшафей С.М.А. Цитотоксическая активность растительных масел *Nigella sativa*, *Salvia officinalis* и пептидных метаболитов *Streptomyces mirabilis* FK749 против раковых клеточных линий HeLa и MCF-7 / С.М.А. Эльшафей, А.А. Абдельрахман, Ш.З. Валидов, А.Г. Бикмуллин, Э.Р. Санатова, Л.М. Залялютдинова, А.Н.

Фаттахова, Ф.К. Алимова // Гены & Клетки. –2014. –Т.9– № 3. –в печати (Список ВАК, РИНЦ– 0,403).

II. Тезисы докладов региональных и международных конференций:

6. **El-Shafei S.M.A.** Rapid evaluation of black seed oil and salvia oil for antifungal activity against some plant pathogenic fungi / S.M.A. El-Shafei, A.A. Abd-El-Rahman, R.I. Tukhbatova, A.M. Sirinovna, E.V. Ivanov, E.A. Akinina, J.E. Voronkova, L.C. Bukuru, F.K. Alimova // Book of abstracts of the 3rd international online conference : biochemistry and biotechnology, Kazan (Volga region) federal university, Kazan, 19-22 November, 2012.– P.340-341.
7. Мухаметзянова А.М. Влияние масла черного тмина, шалфея и культуральной жидкости *Trichoderma* на жизненные показатели мышей / А.М. Мухаметзянова, **С.М.А. Эльшафей**, А.А. Абдельрахман, Р.И. Тухбатова, Е.В. Иванова, Е.А. Акинина, Ю.Е. Воронкова, Л.С. Букуру, Ф.К. Алимова, А.Н. Фаттахова // Сборник трудов III Международная конференция: "Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий" Казанский федеральный Университет, Казань, 19-22 ноября 2012. – С.201-202.
8. **El-Shafei S.M.A.** Screening of ultrastructural changes in maize seedlings treated with *Trichoderma*, black cumin and salvia extract / S.M.A. El-Shafei // Book of abstracts of the 2nd international online scientific conference Biotechnology: Looking to the future, Kazan (Volga region) federal university, Kazan, 26-27 March 2013. – P.423-424.
9. **Эльшафей С.М.А.** Влияние экстракта черного тмина, шалфея и культуральной жидкости *Trichoderma* на некоторые показатели растений *in vivo* / С.М.А. Эльшафей, А.М. Мухаметзянова, А.А. Абдельрахман, Р.И. Тухбатова, Е.В. Иванова, Е.А. Акинина, Ю.Е. Воронкова, Л.С. Букуру, Ф.К. Алимова // Сборник трудов II Международная научная Интернет конференция "Биотехнология. Взгляд в будущее" Казанский федеральный Университет, Казань, 26-27 марта, 2013. –Т.2.– С. 341-342.
10. **El-Shafei S.M.A.** Changes in enzymatic activity of some plant pathogenic fungi treated with *Nigella sativa* and *Salvia officinalis* essential oil / S.M.A. El-Shafei, A.A. Abd-El-Rahman, E.V. Ivanov, R.I. Tukhbatova, A.M. Sirinovna, E.A. Akinina, J.E. Voronkova, F.K. Alimova // Book of abstracts of the 2nd international online scientific conference, "Modern trends in agriculture dedicated to the day of the Russian agricultural workers" Kazan, 10-11 October 2013.–Т.2.–P.133-134.
11. **Эльшафей С.М.А.** Биологическое действия метаболитов масла черного тмина и шалфея лекарственного на биохимические параметры фитопатогенных грибов / С.М.А. Эльшафей, А.А. Абдельрахман, Р.И. Тухбатова, Е.В. Иванова, Е.А. Акинина, Ю.Е. Воронкова, Ф.К. Алимова // Сборник трудов IV Международная научная Интернет-конференция "Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии" Казанский федеральный Университет, Казань, 16-17 октября 2013. – С.164-165.
12. **Эльшафей С.М.А.** Хроматографический анализ метаболитов некоторых фитопатогенных грибов, обработанных маслом черного тмина / С.М.А. Эльшафей, Т.А. Невзорова, А.А. Абдельрахман, Р.И. Тухбатова, Е.В. Иванова, Е.А. Акинина, Ю.Е. Воронкова, Ф.К. Алимова // Сборник трудов международной симпозиумы «Биохимия – основа наук о жизни» посвященного 150-летию образования кафедры

биохимии, Казанский федеральный Университет, Казань, 21-23 ноября 2013. – С.139

13. **El-Shafei S.M.A.** Cytotoxic effects of essential oils of some plants and *Trichoderma* metabolites against cancer cell lines *in vitro* / S.M.A. El-Shafei, E.V. Ivanov, A.A. Abd-El-Rahman, A.N. Fattakhova, F.K. Alimova // Book of abstracts of the 2nd international online scientific conference Biotechnology: Looking to the future, Kazan (Volga region) federal university, Kazan, 25-26 March 2014.–Т.2.–Р.165-166.
14. **El-Shafei S.M.A.** Inhibitory and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and *Salvia officinalis* on HeLa and MCF-7 cancer cell lines by induction of apoptosis / S.M.A. El-Shafei, A.A. Abd El-Rahman, A.G. Bikmullin, F.K. Alimova // Book of abstracts of the 4th international conference on science and applied research "Post-genome methods of analysis in biology and laboratory and clinical medicine", Kazan (Volga region) federal university, Kazan, 29 October – 1 November, 2014.–Р.143.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. проф. **Алимовой Ф.К.** за внимательное отношение к работе; д.б.н., проф. **Абрамовой З.И.** за советы в процессе выполнения диссертационной работы; к.б.н., доц. **Фаттаховой А.Н.** за помощь при приведении исследований на животных; к.б.н. **Абдуллину Т.И.** за помощь в проведении исследований на опухолевых клетках; к.б.н. **Бондарь О.В.** за консультации в процессе выполнения работы по цитотоксичности; **Валидову Ш.З.**, к.б.н., с.н.с. каф. биохимии и биотехнологии за консультативную помощь; д.б.н. проф. **Эльшафей М.А** и **Эльморсей Э.А.** за ценные идеи в процессе выполнения работы. Автор выражает глубокую благодарность **родителям** за поддержку и помощь при выполнении работы. Благодарность выражается к.б.н. **Абдельрахман А.А.** за помощь и советы в процессе выполнения работы. Благодарность выражается всем преподавателям, сотрудникам, аспирантам и студентам кафедры биохимии и биотехнологии КФУ.

Просьба посылать отзывы на автореферат по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой Зинаиде Ивановне.
Факс 8(843)238-76-01, E-mail: atefnagi2000@yahoo.com, Тел: +79518922596.